含蛋氨酸二肽影响奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白合成相关基因表达

陈　璐[1]　常晨城[1]　史彬林[1]　高　民[2]　赵艳丽[1]　闫素梅[1*]

（1.内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018；2.内蒙古自治区农牧业科学院，呼和浩特 010031）

摘　要：本试验旨在研究含蛋氨酸（Met）二肽对奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）内乳蛋白合成相关基因表达的影响。试验分 3 部分，均采用单因子完全随机试验设计，Met 的添加浓度及培养时间分别为 60 μg/mL（0.402 mmol/L）、48 h。第 1 部分，培养液添加 8 种含 Met 二肽[蛋氨酸-蛋氨酸(P-Met-Met)、蛋氨酸-赖氨酸(P-Met-Lys)、蛋氨酸-色氨酸(P-Met-Trp)、蛋氨酸-苯丙氨酸(P-Met-Phe)、蛋氨酸-苏氨酸(P-Met-Thr)、蛋氨酸-异亮氨酸(P-Met-Ile)、蛋氨酸-亮氨酸(P-Met-Leu)、蛋氨酸-缬氨酸(P-Met-Val)]，以不添加二肽为对照，测定 BMECs 乳蛋白合成相关基因（α_{s1}-酪蛋白、β-酪蛋白、κ-酪蛋白、β-乳球蛋白、II 型小肽转运载体和氨肽酶氮）的表达量；第 2 部分，培养液添加 8 种与上述二肽对应的游离氨基酸（F-Met-Met、F-Met-Lys、F-Met-Trp、F-Met-Phe、F-Met-Thr、F-Met-Ile、F-Met-Leu、F-Met-Val），以不添加游离氨基酸为对照，测定 BMECs 乳蛋白合成相关基因的表达量；第 3 部分，用二肽等物质的量替代相应游离氨基酸，测定 BMECs 乳蛋白合成相关基因的表达量以及细胞内外氨肽酶含量。结果表明：P-Met-Met 和 P-Met-Lys 组较对照组和其他二肽组上调了 α_{s1}-酪蛋白和 β-酪蛋白基因的表达量，且 P-Met-Met 组优于 P-Met-Lys 组。F-Met-Met 和 F-Met-Lys 组较对照组和其他游离氨基酸组显著提高了 α_{s1}-酪蛋白基因的表达量（$P<0.05$）。除 P-Met-Val 和 P-Met-Leu 组外，其他二肽替代游离氨基酸后均不同程度地提高了乳蛋白和 II 型小肽转运载体基因的表达量，其中 P-Met-Met 表现出较好的促进效果。总之，含 Met 二肽等量替代对应的游离氨基酸能够促进乳蛋白基因的表达，其中尤以 P-Met-Met 的效果最好。

关键词：奶牛；乳腺上皮细胞；乳蛋白；蛋氨酸；二肽；基因表达

中图分类号：S823

收稿日期：2016-06-07

基金项目：国家奶业“973 计划”项目（2011CB1008003）

作者简介：陈　璐（1990-），女，山西省襄汾人，硕士研究生，从事奶牛营养研究。E-mail：1510560671@qq.com

*通信作者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail： yansmimau@163.com

乳蛋白是评价牛奶质量的重要指标之一。乳成分前体物的组成与含量直接影响乳腺内乳蛋白的合成，进而影响乳品质。蛋氨酸（Met）作为乳蛋白前体物，是乳蛋白合成的主要必需氨基酸，是奶牛第一限制性氨基酸[1]，是乳蛋白合成翻译开始的第 1 个氨基酸，也是机体中最重要的甲基直接供体，蛋白质翻译过程被激活的必需要素就是 5′ 端帽子结构连接核苷酸的核糖需要被甲基化[2]。因此，从 Met 的角度研究对乳蛋白合成的影响及机理，对调控乳腺内乳成分的合成和改善乳品质具有重要意义。Wang 等[3]研究发现，向奶牛饲粮中添加蛋氨酸羟基类似物能够显著提高奶牛的乳产量、乳蛋白含量。然而，用于乳蛋白合成的氨基酸并非全部由血液中的游离氨基酸来供给，乳腺组织还可以摄取小肽和蛋白质等非游离态氨基酸以满足乳蛋白合成的需要[4]。小肽能够弥补乳腺组织对氨基酸摄取的不足，而且能在乳腺蛋白质代谢过程中发挥作用。毕微微[5]的研究发现，蛋氨酸-蛋氨酸（P-Met-Met）和蛋氨酸-赖氨酸（P-Met-Lys）二肽能促进奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）增殖以及 β-酪蛋白（*CSN*2）基因的表达。以 BMECs 为模型，用 P-Met-Met 和 P-Met-Lys 等量替代与它们对应的游离氨基酸，二肽组的 α_{s1}-酪蛋白（*CSN*1*S*1）基因表达与培养液中酪蛋白浓度均显著高于游离氨基酸组[6]。这些研究结果均表明，氨基酸及小肽都在一定程度上影响了奶牛乳蛋白的合成。因此，研究二肽等量替代游离氨基酸对乳蛋白合成的影响，对深入了解乳蛋白前体物对奶牛乳蛋白合成的影响机理及不断提高牛奶品质具有一定理论与实际意义。然而，目前相关的研究较少。鉴于此，本试验以 BMECs 为体外培养模型，研究不同种类的含 Met 二肽对乳蛋白合成相关基因和氨肽酶氮(*APN*)基因表达以及细胞内外氨肽酶（APA）含量的影响，筛选出促进效果明显的二肽组合，为建立适用于奶牛泌乳所需要的二肽营养模式提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

胶原酶Ⅱ、DMEM/F12 培养基、胰岛素转铁蛋白溶液、胎牛血清（FBS）、胰蛋白酶/乙二胺四乙酸（EDTA）和双抗均购自 Gibco 公司；氢化可的松、表皮生长因子、催乳素、Met、赖氨酸（Lys）、色氨酸（Trp）、苯丙氨酸（Phe）、苏氨酸（Thr）、异亮氨酸（Ile）、亮氨酸（Leu）和缬氨酸（Val）均购自 Sigma 公司；P-Met-Met、P-Met-Lys、蛋氨酸-色氨酸(P-Met-Trp)、蛋氨酸-苯丙氨酸(P-Met-Phe)、蛋氨酸-苏氨酸(P-Met-Thr)、蛋氨酸-异亮氨酸(P-Met-Ile)、蛋氨酸-亮氨酸(P-Met-Leu)、蛋氨酸-缬氨酸(P-Met-Val)8 种二肽均购自上海科肽

生物公司（产品编号分别为 PO14103105、PO14103106、PO14103107、PO14103108、PO14103109、PO14103110、PO14103111、PO14103112）；噻唑蓝（MTT）、二甲亚基砜（DMSO）和两性霉素均购自 Amresco 公司；磷酸盐缓冲液（PBS）购自 HyClone 公司；SYBR Premix Ex Taq™ Ⅱ、PrimeScript RT Master Mix 购自 TaKaRa 公司；RNAprep pure Cell/Bacteria Kit 购自 TIANGEN 公司。

主要仪器有：倒置显微镜（Olympuse 公司）；全自动酶标仪（Synergy H4，BioTek 公司）；细胞计数仪（Cytorecon，ECI 公司）；二氧化碳恒温培养（HF-240，力康生物医疗科技控股有限公司）；荧光定量 PCR 仪（ABI-7500，ABI 公司）；电泳仪（Bio-Rad 公司）。

1.2 试验设计

本试验分为 3 部分，均采用单因子完全随机试验设计，试验中使用的 DMEM/F12 培养基中 Met 的含量为 17.24 μg/mL，Met 的添加浓度及培养时间参考本课题组前期研究结果分别定为 60 μg/mL（0.402 mmol/L）、48 h。第 1 部分，研究 8 种含 Met 二肽（P-Met-Met、P-Met-Lys、P-Met-Trp、P-Met-Phe、P-Met-Thr、P-Met-Ile、P-Met-Leu、P-Met-Val）对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达的影响，分为对照组（不添加二肽）和 8 个分别添加 8 种含 Met 二肽的试验组，使每种二肽的浓度均为 0.402 mmol/L。第 2 部分，研究与 8 种二肽相对应的游离氨基酸（F-Met-Met、F-Met-Lys、F-Met-Trp、F-Met-Phe、F-Met-Thr、F-Met-Ile、F-Met-Leu、F-Met-Val）对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达的影响，分为对照组（不添加游离氨基酸）和 8 个分别添加 8 种游离氨基酸混合溶液试验组。游离氨基酸混合溶液中每种氨基酸的浓度与第 1 部分相应的二肽组中的氨基酸浓度一致。第 3 部分，研究用含 Met 的二肽等物质的量替代相应的游离氨基酸后对乳蛋白合成相关基因表达的影响，试验分为 8 个独立的组合，每个组合为 1 种含 Met 的二肽组与相应的游离氨基酸组构成，将每个组合的二肽组与游离氨基酸组进行对比分析，二肽和氨基酸添加浓度与试验第 1、2 部分一致。在 3 个试验中，每组均为 6 个重复，培养基中不加 FBS。

1.3 原代 BMECs 体外培养

BMECs 采用胶原酶消化法获得。取健康荷斯坦奶牛乳腺组织，去除组织表层，于深处取约 1 cm^3 的组织块，放入 4 ℃预冷的 PBS 中。在超净台内用 PBS 将组织块初步洗净后，再去除组织块的表层，并将组织剪成糊状。加入 0.5%胶原酶Ⅱ溶液，于 37 ℃和 5% CO_2 的

条件下消化 1 h，每隔 20 min 缓慢摇晃离心管。消化液用孔径为 80 目的细胞滤网过滤，收集细胞滤液，179×*g* 离心 5 min，弃上清。加入完全培养基，吹打均匀，然后转入 25 cm^2 细胞培养瓶中，在 37 ℃和 5% CO_2 培养箱中培养。当细胞融合度达到 80%~90%时，依据 BMECs 和成纤维细胞对胰蛋白酶消化敏感性不同的特点，对细胞进行纯化并传代。将传至第 3 代的 BMECs 悬液接种于 25 cm^2 培养瓶中，置于 37 ℃和 5%CO_2 培养箱中培养[7]。

1.4 测试指标与方法

1.4.1 BMECs 内乳蛋白合成相关基因的表达量

将第 3 代的 BMECs，以 $2×10^5$ 个/孔密度接种于 6 孔培养板上，每组 6 个重复。培养结束后，细胞总 RNA 按照 RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒的方法提取，总 RNA 的完整性和纯度用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳和酶标仪检测。反转录 PCR 采用 PrimeScript ^{RT} Master Mix 试剂盒的方法进行，得到的 cDNA 用 SYBR Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒进行荧光定量 PCR，反应体系为 20 μL。用磷酸甘油醛脱氢酶（*GAPDH*）作为内参基因，对乳蛋白合成相关基因[αs1-酪蛋白（*CSN*1*S*1）、*CSN*2、κ-酪蛋白（*CSN*3）、β-乳球蛋白(*LGB*)、Ⅱ型小肽转运载体(*PEPT*2)和 *APN*]的表达量进行测定，引物序列及参数见表 1。荧光定量 PCR 反应程序为：95.0 ℃（预变性）30 s；95.0 ℃（变性）30 s；退火温度 30 s；72.0 ℃（延伸）20 s，40 个循环；72 ℃（延伸）7 min。熔解曲线程序为：70~95 ℃，每 6 s 升温 0.5 ℃，共 51 个循环，荧光定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

表 1 引物序列及参数

Table 1 Primer sequences and parameters

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5′-3′)	GenBank 登录号 GenBank accession No.	长度 Length/bp	退火温度 Tm/℃	参考文献 References
αs1-酪蛋白 *CSN*1*S*1	F：AATCCATGCCCAACAGAAAG R：TCAGAGCCAATGGGATTAGG	BC109618	189	59	Zhou 等[8]
β-酪蛋白 *CSN*2	F：GTGAGGAACAGCAGCAAACA R：CCAGGAGCAAAACCAAGAAC	NM_181008	115	55	Zhou 等[8]
κ-酪蛋白 *CSN*3	F：CCAGGAGCAAAACCAAGAAC R：TGCAACTGGTTTCTGTTGGT	NM_174294	148	56	Zhou 等[8]
β-乳球蛋白 *LGB*	F：CTTGTGCTGGACACCGACTA R：TTGAGGGCTTTGTCGAATTT	NM_173929	146	61	Zhou 等[8]
磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH*	F：GGGTCATCATCTCTGCACCT R：GGTCATAAGTCCCTCCACGA	XM_001252479	177	60	Zhou 等[8]
Ⅱ型小肽转运载体 *PEPT*2	F：ATGGCAATGCCCAATGAAG	NM-001079582	189	59	自行设计

	R：CACCAACACAGCAACAAACAAA				
氨肽酶氮 *APN*	F：TCCTCCAGCAGCAACAAAGA R：TCAGCCACAGGTCATTCCAC	NM_001075144	115	55	自行设计

F：上游引物；R：下游引物。

F: forward primer; R: reverse primer.

1.4.2 BMECs 内和细胞培养液中氨肽酶（APA）的含量

细胞培养 48 h 后，将细胞培养液 15 000 g/min 在 4 ℃离心 10 min，取上清；将细胞用 PBS 清洗 3 遍，向每孔加入 70 μL 的细胞裂解液，4 ℃孵育 30 min 后刮下细胞，4 ℃ 15 000 g/min 离心 10 min，取上清。提取出的 APA 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书的步骤进行检测。

1.5 数据处理与分析

所有数据用 Excel 进行计算整理。试验数据采用 SAS 9.0 软件进行统计，第 1 部分与第 2 部分的数据用 ANOVA 程序进行单因素方差分析，并用 Duncan 氏法进行多重比较；第 3 部分二肽组与游离氨基酸组的数据用 t 检验进行分析。$P<0.05$ 表示差异显著，$0.05≤P<0.10$ 表示差异趋于显著。

2 结 果

2.1 含 Met 的二肽对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达量的影响

表 2 的结果表明，对于 *CSN1S1* 基因表达量，P-Met-Met 组较对照组和其他二肽组显著提高（$P<0.05$），P-Met-Lys 组较对照、P-Met-Leu 和 P-Met-Val 组显著提高（$P<0.05$）；对于 *CSN2* 基因表达量，P-Met-Met、P-Met-Lys 组较对照组、P-Met-Thr、P-Met-Trp、P-Met-Leu、P-Met-Ile 和 P-Met-Val 组显著升高（$P<0.05$），P-Met-Phe 组较 P-Met-Thr、P-Met-Leu、P-Met-Ile 和 P-Met-Val 组显著升高（$P<0.05$）；对于 *CSN3* 基因表达量，P-Met-Met、P-Met-Lys、P-Met-Phe 和 P-Met-Ile 组较 P-Met-Thr、P-Met-Trp、P-Met-Leu 和 P-Met-Val 组显著提高（$P<0.05$）；8 种二肽对 *LGB*、*PEPT2* 和 *APN* 基因表达量均无显著影响（$P>0.05$）。

表 2 含 Met 的二肽对 BMECs 内乳蛋白、*PEPT2* 和 *APN* 基因表达的影响

Table 2 Effects of dipeptides containing Met on gene expressions of milk proteins, *PEPT2* and *APN* in BMECs

组别 Groups	αs1-酪蛋白 *CSN1S1*	β-酪蛋白 *CSN2*	κ-酪蛋白 *CSN3*	β-乳球蛋白 *LGB*	II 型小肽转运载体 *PEPT2*	氨肽酶氮 *APN*
对照 Control	1.00^{c}	1.00^{c}	1.00^{b}	1.00	1.00	1.00

P-Met-Met	1.44^{a}	1.13^{ab}	1.15^{a}	0.98	1.06	1.06
P-Met-Lys	1.22^{b}	1.17^{a}	1.11^{ab}	0.98	1.07	1.08
P-Met-Phe	1.08^{bc}	1.04^{bc}	1.05^{ab}	0.99	1.01	1.04
P-Met-Thr	1.07^{bc}	0.85^{d}	0.83^{c}	0.98	1.02	1.10
P-Met-Trp	1.09^{bc}	1.00^{c}	0.86^{c}	0.96	1.03	1.09
P-Met-Leu	0.99^{c}	0.85^{d}	0.85^{c}	1.00	1.03	1.04
P-Met-Ile	1.11^{bc}	0.84^{d}	1.12^{ab}	1.01	1.08	1.03
P-Met-Val	1.03^{c}	0.84^{d}	0.78^{c}	0.98	1.04	1.06
SEM	0.13	0.10	0.11	0.08	0.06	0.10
P 值 *P*-value	<0.01	<0.01	<0.01	0.98	0.27	0.83

同列数据肩标相同或无字母表示差异不显著（*P*>0.05），不同字母表示差异显著（*P*<0.05）。下表同。

Values in the same column with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (*P*< 0.05). The same as below.

2.2 游离氨基酸对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达的影响

表 3 结果表明，F-Met-Met、F-Met-Lys 组的 *CSN*1*S*1 基因表达量显著高于对照组和其他游离氨基酸组（*P*<0.05）；F-Met-Met、F-Met-Lys、F-Met-Phe 和 F-Met-Leu 组的 *CSN*2 基因表达量显著高于 F-Met-Thr 组（*P*<0.05）；对于 *CSN*3 基因表达量，F-Met-Met、F-Met-Phe、F-Met-Trp 和 F-Met-Leu 组较 F-Met-Thr 组显著升高（*P*<0.05），F-Met-Lys 组较 F-Met-Phe、F-Met-Thr、F-Met-Trp、F-Met-Leu、F-Met-Ile 和 F-Met-Val 组显著升高（*P*<0.05）；对于 *PEPT*2 基因表达量，F-Met-Met 组较 F-Met-Trp、F-Met-Leu、F-Met-Ile 和 F-Met-Val 组显著升高（*P*<0.05），F-Met-Lys 组较 F-Met-Ile 组显著提高（*P*<0.05）；各组 *LGB* 和 *APN* 基因表达量均无显著差异（*P*>0.05）。

表 3 游离氨基酸对 BMECs 内乳蛋白、*PEPT*2 和 *APN* 基因表达的影响

Table 3 Effects of free amino acids on gene expressions of milk protein, *PEPT*2 and *APN* in BMECs

组别 Groups	αs1-酪蛋白 *CSN*1*S*1	β-酪蛋白 *CSN*2	κ-酪蛋白 *CSN*3	β-乳球蛋白 *LGB*	II 型小肽转运载体 *PEPT*2	氨肽酶氮 *APN*
对照 Control	1.00^{b}	1.00^{ab}	1.00^{ab}	1.00	1.00^{ab}	1.00
F-Met-Met	1.17^{a}	0.98^{ab}	0.97^{abc}	1.01	1.02^{a}	0.96
F-Met-Lys	1.13^{a}	1.01^{a}	1.07^{a}	1.02	0.98^{ab}	0.99
F-Met-Phe	0.97^{b}	0.99^{ab}	0.93^{bcd}	1.03	0.96^{abc}	0.91
F-Met-Thr	1.03^{b}	0.85^{c}	0.76^{e}	0.99	0.97^{ab}	0.96
F-Met-Trp	0.98^{b}	0.93^{abc}	0.93^{bcd}	1.01	0.93^{bc}	0.97
F-Met-Leu	0.99^{b}	1.01^{a}	0.91^{bcd}	1.05	0.92^{bc}	0.96
F-Met-Ile	1.00^{b}	0.91^{bc}	0.86^{cde}	0.99	0.90^{c}	1.00
F-Met-Val	0.99^{b}	0.97^{ab}	0.83^{de}	0.99	0.94^{bc}	0.93

SEM	0.06	0.07	0.09	0.07	0.05	0.07
P 值 *P*-value	<0.01	<0.01	<0.01	0.80	0.01	0.58

2.3 二肽等量替代游离氨基酸对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达及 BMECs 内外 APA 含量的影响

表 4 结果表明，与 F-Met-Met 组相比，P-Met-Met 组显著上调了 *CSN*1*S*1、*CSN*2 和 *CSN*3 基因的表达量（*P*<0.05）；P-Met-Lys 组和 F-Met-Lys 组相比，*CSN*2 的基因表达量显著上调（*P*<0.05），*PEPT*2 的基因表达量趋于显著提高（*P*=0.09）；与 F-Met-Phe 组相比，P-Met-Phe 组显著提高了 *CSN*1*S*1 和 *APN* 基因的表达量（*P*<0.05）；P-Met-Trp 组的 *CSN*1*S*1 和 *PEPT*2 基因表达量显著高于 F-Met-Trp 组（*P*<0.05），对 *APN* 基因的表达量有显著提高的趋势（*P*=0.06）；与 F-Met-Leu 组相比，P-Met-Leu 组的 *CSN*2 基因的表达量显著降低（*P*<0.05），*PEPT*2 基因的表达量显著升高（*P*<0.05），*APN* 基因表达量有显著升高的趋势（*P*=0.06）；与 F-Met-Ile 组相比，P-Met-Ile 组的 *CSN*1*S*1、*CSN*3 和 *PEPT*2 基因的表达量显著上调（*P*<0.05）；P-Met-Val 组 *PEPT*2 和 *APN* 基因表达量显著高于 F-Met-Val 组（*P*<0.05）。

在细胞外，P-Met-Met 组和 P-Met-Lys 组的 APA 含量趋于显著地低于相应的游离氨基酸组（*P*=0.06，*P*=0.07），其他二肽替代游离氨基酸后 APA 的含量变化均不显著（*P*＞0.05）；在细胞内，8 种二肽替代游离氨基酸后对 APA 含量影响不显著（*P*＞0.05）。

表 4 二肽等量替代游离氨基酸对 BMECs 内乳蛋白、*PEPT*2、*APN* 基因表达及 BMECs 内外 APA 含量的影响

Table 4 Effects of substitution of free amino acids with dipeptides on gene expressions of milk protein, *PEPT*2 and *APN* in BMECs and APA content inside and outside BMECs

组别 Groups	αs1-酪蛋白 *CSN*1*S*1	β-酪蛋白 *CSN*2	κ-酪蛋白 *CSN*3	β-乳球蛋白 *LGB*	II 型小肽转运载体 *PEPT*2	氨肽酶氮 *APN*	细胞外 Extracellular 氨肽酶 APA/(pg/mL)	细胞内 Intracellular 氨肽酶 APA/(pg/mL)
P-Met-Met	1.44[a]	1.13[a]	1.15[a]	0.98	1.05	1.05	1 422.52	755.98
F-Met-Met	1.17[b]	0.98[b]	0.97[b]	1.01	1.01	0.96	1 540.92	800.03
P 值 *P*-value	0.04	0.03	0.01	0.49	0.10	0.15	0.06	0.12
P-Met-Lys	1.22	1.17[a]	1.11	0.98	1.07	1.07	1 410.31	817.54
F-Met-Lys	1.13	1.01[b]	1.07	1.02	0.98	0.99	1 427.54	810.81
P 值 *P*-value	0.22	0.02	0.50	0.48	0.09	0.10	0.07	0.79
P-Met-Phe	1.08[a]	1.04	1.04	0.99	1.01	1.04[a]	1 477.58	820.54
F-Met-Phe	0.96[b]	0.98	0.93	1.03	0.96	0.91[b]	1 562.57	805.91
P 值 *P*-value	0.03	0.26	0.08	0.45	0.37	0.04	0.20	0.74

P-Met-Thr	1.07	0.85	0.83	0.97	1.02	1.09	1 610.41	785.73
F-Met-Thr	1.03	0.84	0.75	0.99	0.97	0.95	1 650.73	782.53
P 值 *P*-value	0.27	0.94	0.18	0.80	0.15	0.08	0.25	0.21
P-Met-Trp	1.09^{a}	1.00	0.86	0.95	1.03^{a}	1.09	1 505.59	912.53
F-Met-Trp	0.97^{b}	0.92	0.94	1.01	0.93^{b}	0.97	1 545.21	937.52
P 值 *P*-value	<0.01	0.11	0.21	0.22	0.02	0.06	0.38	0.35
P-Met-Leu	0.98	0.85^{a}	0.85	1.00	1.03^{a}	1.04	1 487.52	890.09
F-Met-Leu	0.99	1.01^{b}	0.91	1.05	0.92^{b}	0.97	1 450.84	827.51
P 值 *P*-value	0.79	0.01	0.31	0.32	0.02	0.06	0.33	0.40
P-Met-Ile	1.11^{a}	0.84	1.12^{a}	1.01	1.08^{a}	1.02	1 420.62	782.54
F-Met-Ile	1.00^{b}	0.91	0.86^{b}	1.00	0.89^{b}	1.00	1 460.92	775.01
P 值 *P*-value	0.02	0.23	0.01	0.75	<0.01	0.57	0.88	0.76
P-Met-Val	1.03	0.83	0.78	0.97	1.04^{a}	1.06^{a}	1 595.54	810.02
F-Met-Val	0.99	0.97	0.83	0.99	0.93^{b}	0.94^{b}	1 560.09	827.51
P 值 *P*-value	0.55	0.05	0.49	0.74	0.01	0.01	0.72	0.19

3 讨 论

牛奶乳蛋白的 90%是由奶牛乳腺组织以氨基酸为原料合成的，并且用于乳腺内从头合成乳蛋白的氨基酸，90%以上是从血液当中吸收的[9]。然而有研究表明，乳腺组织不仅能从血液中单纯地摄取游离氨基酸合成乳蛋白，而且也能摄取以肽形式结合的必需氨基酸合成乳蛋白，但机理尚不明确[10]。周苗苗等[11]研究含 Lys 二肽对 BMECs 中乳蛋白合成的影响发现，添加 Lys 二肽能促进乳蛋白的合成。小肽被动物组织吸收利用依赖于其独立的转运载体系统，主要靠依赖 H^+和 Ca^{2+}的逆浓度梯度进行转运的，小肽转运载体具有转运速率快、吸收耗能低及不易饱和等特点[12]，而游离氨基酸转运载体与之相反，因此动物组织对小肽的利用效率在理论上绝对高于游离氨基酸。PEPT2 是一种低容量、高亲和力的肽载体[13]，主要转运二肽和三肽类营养物质或仿肽类药物[14]。泌乳奶牛乳腺外植体试验研究指出，PEPT2 的转运功能受到抑制会明显减少乳蛋白合成[15]。Zhou 等[16]的研究指出，BMECs 能摄取苯丙氨酸-苯丙氨酸（P-Phe-Phe）二肽促进 *PEPT2* 基因的表达并用于乳蛋白的合成，说明 PEPT2 可能在乳腺摄取小肽的过程中发挥着重要的作用。BMECs 的表面存在一种能够将小肽水解成游离氨基酸的 APA，APA 是乳腺组织为乳蛋白合成提供氨基酸的肽酶之一[17]，当氨基酸水平不能满足机体泌乳需要时，细胞内或细胞外会发出代谢信号调节其表达活性。因此，小肽能够通过小肽转运载体和 APA 水解 2 个途径被乳腺组织吸收利用[17-18]。刘辉等[19]研究山羊乳腺对大豆小肽的吸收利用影响发现，灌注小肽促进了 *APN* 基因的表达，同时显著促进了乳蛋白合成。本试验结果表明，与对照组相比，P-Met-Met 和 P-Met-Lys 组提高了 *CSN1S1*

和 *CSN*2 基因的表达，促进了乳蛋白的合成，以 P-Met-Met 组的效果更好，并且除 P-Met-Met、P-Met-Phe 和 P-Met-Thr 组外，其他二肽组的 *PEPT*2 基因表达量均显著或趋于显著地高于游离氨基酸组；通过对 APA 含量进行检测发现，在细胞内和细胞外均存在 APA，且除 P-Met-Met、P-Met-Lys 和 P-Met-Ile 组外，其他二肽组的 *APN* 基因表达量均显著或趋于显著地高于游离氨基酸组，说明 BMECs 能产生 APA，将二肽水解为游离氨基酸为乳蛋白的合成提供底物，并且可利用二肽合成乳蛋白。

一项含 Met 的肽的试验研究发现，不同种类的含 Met 二肽被 BMECs 利用效率不同，二肽形式结合的 Met 被利用的效率相当于游离蛋基酸利用效率的 35%~122%，其中 P-Met-Val、P-Met-Leu 和亮氨酸-蛋氨酸（P-Leu-Met）二肽的利用能力要高于对应的游离氨基酸[20]。本试验得出，BMECs 中用含 Met 的 8 种二肽等量替代相应的游离氨基酸后，除 P-Met-Val 和 P-Met-Leu 外，其他二肽比游离氨基酸能更好地促进 *CSN*1*S*1、*CSN*2 和 *CSN*3 基因的表达，尤其以 P-Met-Met 的促进效果更好，与 F-Met-Met 相比分别增加了 23.1%、15.3%和 18.5%；其次是 P-Met-Phe 和 P-Met-Lys，分别较相应的游离氨基酸组增加了 12.5%、6.1%、11.8%和 8.0%、15.8%、3.7%。说明 BMECs 对二肽的利用效率高于相应的游离氨基酸。二肽组 *PEPT*2 和 *APN* 基因表达量也高于对应的游离氨基酸组，进一步说明 BMECs 能通过既摄取二肽也摄取氨基酸来合成乳蛋白，而且小肽与游离氨基酸相比能更有效地促进乳蛋白的合成。然而，小肽是如何进入细胞被利用以及二肽与游离氨基酸保持多大比例更适于乳蛋白的合成，本试验尚未进行研究，其确切的机理需要进一步探讨。

4 结　论

含 Met 二肽等物质的量替代对应的游离氨基酸能够促进乳蛋白基因的表达，其中以 P-Met-Met、P-Met-Lys、P-Met-Phe 和 P-Met-Ile 的促进效果较好，尤以 P-Met-Met 的效果最明显。

参考文献：

[1] ROBINSON P H,CHALUPA W,SNIFFEN C J,et al.Influence of postruminal supplementation of methionine and lysine,isoleucine,or all three amino acids on intake and chewing behavior,ruminal fermentation,and milk and milk component production[J].Journal of Animal Science,1999,77(10):2781–2792.

[2] TAGARI H,HUBER T,Jr,THEURER B,et al.Portal drained visceral flux,hepatic metabol-ism,and mammary uptake of free and peptide-bound amino acids and milk amino acid output in dairy cows fed diets containing corn grain steam flaked at 360 or steam rolled at 490g/L[J].Journal of Dairy Science,2004,87(2):413–430.

[3] WANG C,LIU H Y,WANG Y M,et al.Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2010,93(8):3661–3670.

[4] 毕微微,高学军,林叶,等.营养素调控奶牛乳蛋白合成的研究进展[J].乳业科学与技术,2012,35(4):33–35.

[5] 毕微微.蛋氨酸、赖氨酸二肽对奶牛乳腺上皮细胞泌乳机能的影响[D].硕士学位论文.哈尔滨:东北农业大学,2013.

[6] WU H H,YANG J Y,ZHAO K,et al.Effects of methionine-containing dipeptides on alphaS1 casein expression in bovine mammary epithelial cells[J].Journal of Animal and Feed Sciences,2007,16(2):325–329.

[7] SHI H Y,YAN S,JIN L,et al.Vitamin A affects the expression of antioxidant genes in b-ovine mammary epithelial cells with oxidative stress induced by diethylene triamine-nitric oxide polymer[J].Czech Journal of Animal Science,2016,61(3):117–126.

[8] ZHOU Y,AKERS R M,JIANG H.Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells[J].Journal of Dairy Science,2008,91(1):100–108.

[9] BACKWELL F R,BEQUETTE B J,WILSON D,et al.Evidence for the utilization of peptides for milk protein synthesis in the lactating dairy goat in vivo[J].The American Journal of Physiology,1996,271(4 Pt 2):955–960.

[10] FARRELL H M,Jr,JIMENEZ-FLORES R,BLECK G T,et al.Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision[J].Journal of Dairy Science,2004,87(6):1641–1674.

[11] 周苗苗,崔景香.含赖氨酸二肽对奶牛乳蛋白合成和乳腺氨基酸转运相关基因表达的影响[J].中国畜牧兽医,2016,43(5):1156–1161.

[12] GRONEBERG D A,DÖRING F,THEIS S,et al.Peptide transport in the mammary gland:expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein[J].American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,2002,282(5):E1172-E1179.

[13] 于辉,李华,关绣霞,等.小肽转运载体的分子营养学的研究进展[J].佛山科学技术学院学报:自然科学版,2005,23(3):77–80.

[14] 杨建香,金晓露,魏宁波,等.小肽转运载体 2 的转运机制及功能研究[J].动物营养学报,2013,25(6):1174–1179.

[15] ZHOU M M,WU Y M,LIU H Y,et al.Effects of tripeptides and lactogenic hormones on oligopeptide transporter 2 in bovine mammary gland[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2010,95(6):781–789.

[16] ZHOU M M,WU Y M,LIU H Y,et al.Effects of phenylalanine and threonine oligopeptides on milk protein synthesis in cultured bovine mammary epithelial cells[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2015,99(2):215–220.

[17] SHENNAN D B,CALVERT D T,BACKWELL F R C,et al.Peptide aminonitrogen transport by the lactating rat mammary gland[J].Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,1998,1373(1):252–260.

[18] ELMLINGER M W,GRUND R,BUCK M,et al.Limited proteolysis of the IGF binding protein-2 (IGFBP-2) by a specific serine protease activity in early breast milk[J].Pediatric Research,1999,46(1):76–81.

[19] 刘辉,王玲,李胜利,等.十二指肠大豆小肽梯度灌注对山羊乳腺氨基酸吸收与氨肽酶 N 基因表达的影响[J].畜牧兽医学报,2009,40(12):1761–1768.

[20] 李海燕.日粮氨基酸构成对奶山羊泌乳性能影响的研究[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2007.

Dipeptides Containing Methionine Affects Gene Expressions Involved in Milk Protein Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells

CHEN Lu[1] CHANG Chencheng[1] SHI Binlin[1] GAO Min[2] ZHAO Yanli[1] YAN Sumei[1*]

*Corresponding author, professor, E-mail:yansmimau@163.com

（责任编辑　王智航）

（1. *College of Animal Science*, *Inner Mongolia Agricultural University*, *Hohhot* 010018, *China*;
2. *Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences*, *Hohhot* 010031, *China*）

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of dipeptides containing methionine on gene expressions involved in milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells (BMECs). The study consisted of three parts and adopted completely random single-factor designs. Concentration of methionine and incubation time were 60 μg/mL (0.402 mmol/L) and 48 h, respectively. Part 1, eight kinds of dipeptides [methionine-methionine (P-Met-Met), methionine-lysine (P-Met-Lys), methionine-tryptophan (P-Met-Trp), methionine-phenylalanine (P-Met-Phe), methionine-threonine (P-Met-Thr), methionine-isoleucine (P-Met-Ile), methionine-leucine (P-Met-Leu) and methionine-valine (P-Met-Val)] were supplemented in culture medium, and culture medium without dipeptide supplementation was used as control; milk protein synthesis related gene α-casein (*CSN*1*S*1), β-casein (*CSN*2), κ-casein (*CSN*3), β-lactoglobulin (*LGB*), pep tide transporter 2 (*PEPT*2) and aminopeptidase nitrogen (*APN*) expressions in BMECs were determined. Part 2, eight kinds of free amino acids (F-Met-Met, F-Met-Lys, F-Met-Trp, F-Met-Phe, F-Met-Thr, F-Met-Ile, F-Met-Leu and F-Met-Val) corresponded with the above dipeptides, and culture medium without free amino acids supplementation was used as control; milk protein synthesis related gene expressions in BMECs were determined. Part 3, dipeptides containing methionine equimolarly substituted corresponding free amino acids; milk protein synthesis related gene expressions in BMECs and APA content inside and outside BMECs were determined. The results showed as follows: gene expressions of *CSN*1*S*1 and *CSN*2 were greater in P-Met-Met and P-Met-Lys groups than in other groups, and greater expressions were detected in P-Met-Met group than in P-Met-Lys group. Gene expressions of *CSN*1*S*1 was significantly increased in F-Met-Met and F-Met-Lys groups versus other groups (P<0.05). Except P-Met-Val and P-Met-Leu groups, dipeptides containing methionine substitution of corresponding free amino acids up-regulated the expressions of milk protein synthesis related genes and *PEPT*2 gene, and P-Met-Met had the best effect. In conclusion, dipeptides containing

methionine equimolarly substitution of corresponding free amino acids can increase milk protein synthesis related gene expressions, especially P-Met-Met.

Key words: dairy cow; mammary epithelial cells; milk protein; methionine; dipeptide; gene expression